

## PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 29 June 2000 (29.06.00)	Assistant Commissioner for Patents United States Patent and Trademark Office Box PCT Washington, D.C.20231 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
International application No. PCT/DE99/03946	Applicant's or agent's file reference E 0397 WO
International filing date (day/month/year) 10 December 1999 (10.12.99)	Priority date (day/month/year) 17 December 1998 (17.12.98)
Applicant ENGELHARDT, Johann	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

 in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

17 May 2000 (17.05.00)

 in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

---

2. The election  was was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Henrik Nyberg  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

THIS PAGE BLANK (reverse)

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>E 0397 WO</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 99/ 03946</b>	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) <b>10/12/1999</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>17/12/1998</b>
Anmelder <b>LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3.  **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

**6. Folgende Abbildung der Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. \_\_\_\_\_

wie vom Anmelder vorgeschlagen

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.

THIS PAGE BLANK (useful)

## F Id III WORTLAUT DER ZUSAMMENFASSUNG (Fortsetzung von Punkt 5 auf Blatt 1)

Ein Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten, insbesondere mittels konfokaler Laserscanmikroskopie, ist dadurch gekennzeichnet, dass den Strukturen Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Eigenschaften zugeordnet werden und dass der Nachweis der Strukturen durch Nachweis der in bzw. an den Präparaten spezifisch gebundenen Teilchen erfolgt. Vorteilhafterweise erfolgt der Nachweis dadurch, dass die Strukturen mit Metallteilchen mit Durchmessern im Bereich 10nm-1500nm markiert werden und Miestreuung oder ein Plasmonensignal nachgewiesen wird.

THIS PAGE BLANK (USP&D)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03946

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSRECHENSTANDES  
IPK 7 G02B21/00 G01N21/55

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 843 651 A (D.I. STIMPSON ET AL.) 1. Dezember 1998 (1998-12-01)	1, 2, 4-8, 12-14, 21, 22, 29, 31 28
A	Spalte 2, Zeile 10 - Zeile 27 Spalte 7, Zeile 31 - Zeile 35 Spalte 8, Zeile 57 - Spalte 9, Zeile 9 Spalte 14, Zeile 15 - Zeile 27 Spalte 19, Zeile 35 - Spalte 20, Zeile 51 ---	
X	EP 0 254 430 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC) 27. Januar 1988 (1988-01-27)  Seite 3, Zeile 48 - Seite 4, Zeile 9 Seite 3, Zeile 37 - Zeile 40 ---	1, 2, 4-8, 12-14, 21-23, 29  -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  
 "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
 "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
 "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  
 "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  
 "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist  
 "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden  
 "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist  
 "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13. März 2000

21/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Scheu, M

THIS PAGE BLANK (USP10)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/03946

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEGENEN UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 326 375 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC.) 2. August 1989 (1989-08-02)  Spalte 7, Zeile 33 -Spalte 8, Zeile 60 Spalte 15, Zeile 48 - Zeile 52 -----	1,2,4-8, 12-14, 21,22, 24,29-31
P,X	WO 99 13319 A (AFFYMETRIX INC ;RAVA RICHARD P (US); TRULSON MARK O (US); WALTON I) 18. März 1999 (1999-03-18)  Seite 1 -Seite 2, Absatz 1 Seite 7, Absatz 4 -Seite 8, Absatz 2 Seite 10, Absatz 1 Seite 11, Absatz 4 -----	1,4-8, 12,14, 21,22, 28-30

THIS PAGE BLANK (reverse)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03946

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5843651	A	01-12-1998	US	5599668 A	04-02-1997
			AU	3636295 A	09-04-1996
			CA	2197321 A	28-03-1996
			EP	0783683 A	16-07-1997
			JP	10506190 T	16-06-1998
			WO	9609532 A	28-03-1996
<hr/>					
EP 0254430	A	27-01-1988	AT	94285 T	15-09-1993
			AU	597077 B	24-05-1990
			AU	7478387 A	07-01-1988
			CA	1288689 A	10-09-1991
			DE	3787332 D	14-10-1993
			DE	3787332 T	07-04-1994
			JP	2591750 B	19-03-1997
			JP	63008560 A	14-01-1988
			MX	169795 B	27-07-1993
			US	5017009 A	21-05-1991
<hr/>					
EP 326375	A	02-08-1989	US	5017009 A	21-05-1991
			AU	2833389 A	27-07-1989
			CA	1317006 A	27-04-1993
			DK	33589 A	28-07-1989
			GR	1000729 B	23-11-1992
			JP	1282447 A	14-11-1989
			PT	89541 A,B	04-10-1989
			US	4979821 A	25-12-1990
<hr/>					
WO 9913319	A	18-03-1999	AU	9378898 A	29-03-1999

THIS PAGE BLANK (USP01)

PCT

TORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

R.H.

<b>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>:</b> <b>G02B 21/00, G01N 21/55</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 00/36450</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> <b>22. Juni 2000 (22.06.00)</b>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> <b>PCT/DE99/03946</b> <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> <b>10. Dezember 1999 (10.12.99)</b>		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 58 431.8 17. Dezember 1998 (17.12.98) DE 199 50 909.3 22. Oktober 1999 (22.10.99) DE		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 518, D-69120 Heidelberg (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> ENGELHARDT, Johann [DE/DE]; Schiessmauerweg 6, D-76669 Bad Schönborn (DE).			

**(54) Title:** METHOD FOR DIFFERENTIATED INVESTIGATION OF DIVERSE STRUCTURES IN PREFERABLY BIOLOGICAL PREPARATIONS

**(54) Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR DIFFERENZIERTEN UNTERSUCHUNG UNTERSCHIEDLICHER STRUKTUREN IN VORZUGSWEISE BIOLOGISCHEN PRÄPARATEN

**(57) Abstract**

The invention relates to a method for examining different structures in preferably biological preparations in a differentiated manner, especially by means of confocal laser scanning microscopy. The method is characterised in that particles having a specific diameter and specific characteristics are assigned to the structures and in that said structures are detected by detecting the particles which have specifically bonded in or to the preparations. The detection process is carried out in an advantageous manner by marking the structures with metal particles with diameters of 10 nm to 1,500 nm and detecting Mie scattering or a plasmon signal.

**(57) Zusammenfassung**

Ein Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten, insbesondere mittels konfokaler Laserscanmikroskopie, ist dadurch gekennzeichnet, dass den Strukturen Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Eigenschaften zugeordnet werden und dass der Nachweis der Strukturen durch Nachweis der in bzw. an den Präparaten spezifisch gebundenen Teilchen erfolgt. Vorteilhafterweise erfolgt der Nachweis dadurch, dass die Strukturen mit Metallteilchen mit Durchmessern im Bereich 10nm-1500nm markiert werden und Mie-Streuung oder ein Plasmonensignal nachgewiesen wird.

### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten,  
5 insbesondere mittels konfokaler Laserscanmikroskopie.

Grundsätzlich handelt es sich hierbei um ein Nachweis-/Markierungsverfahren, insbesondere um ein Verfahren, wie es im Rahmen der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie im biomedizinischen Bereich Anwendung findet. Die bislang angewandte Fluoreszenzmikroskopie ist jedoch in der Praxis äußerst  
10 problematisch, zumal die dort verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit der Zeit ausbleichen, nämlich eine die Reproduktion von Untersuchungen ausschließende Ausbleichcharakteristik aufweisen. Aufgrund dieser Ausbleichcharakteristik verändern sich bereits im Verlauf des Mikroskopierens die Fluoreszenzintensitäten, und zwar insbesondere bei anhaltender Bestrahlung des  
15 Fluoreszenzfarbstoffs mit Anregungslicht. Dies macht nicht nur eine Reproduktion der Untersuchung unmöglich, erschwert vielmehr auch jede Untersuchung nach bereits erfolgter Bestrahlung des biologisch/medizinischen Präparats oder macht eine solche Untersuchung – im Hinblick auf eine zuverlässige Auswertung – nahezu unmöglich.

20 Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein gattungsgemäßes Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten, insbesondere mittels konfokaler Laserscanmikroskopie, derart auszustalten, dass die Reproduktion der Markierung bzw. des Untersuchungsergebnisses auch nach längerer  
25 Bestrahlung gewährleistet ist. Die bei der Fluoreszenzmikroskopie bzw. in

Verbindung mit Fluoreszenzfarbstoffanbindung auftretenden Probleme sollen vermieden werden.

Voranstehende Aufgabe wird durch die Merkmale des Patentanspruches 1 gelöst. Danach ist das gattungsbildende Verfahren zur differenzierten

- 5 Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten dadurch gekennzeichnet, dass den Strukturen Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Eigenschaften zugeordnet werden und dass der Nachweis der Strukturen durch Nachweis der in bzw. an den Präparaten spezifisch gebundenen Teilchen erfolgt.
- 10 In vorteilhafter Weise erfolgt der Nachweis der Teilchen dadurch, dass die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, dass sich die Teilchen aufgrund der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung bzw. Mie-Reflexe nachweisen lassen.
- 15 Alternativ kann der Nachweis der Teilchen auch durch Detektion des Plasmonen-Signals der Teilchen erfolgen.

Erfindungsgemäß ist erkannt worden, dass das im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie auftretende Problem grundsätzlich auf die Ausbleichcharakteristik der verwendbaren Fluoreszenzfarbstoffe zurückzuführen ist. Erfindungsgemäß wird von dem im biomedizinischen Bereich üblicherweise angewandten Markierungsverfahren abgegangen, werden nämlich die im Präparat interessierenden Strukturen nicht mit irgendwelchen Farbstoffen markiert, sondern mit Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Materialeigenschaften. Während es bei der Fluoreszenzfarbstoffanbindung auf das Fluoreszenzverhalten der den Strukturen zugeordneten Fluoreszenzfarbstoffe ankommt, spielen die optischen Eigenschaften der

Teilchen zunächst keine Rolle. Vielmehr kommt es hierbei auf den Durchmesser und auf die Materialeigenschaften der Teilchen an.

Die Teilchen werden also - sofern erforderlich - mittels geeigneter Bindemittel den jeweiligen Strukturen bzw. Bereichen der Präparate zugeordnet, wobei die

- 5 Teilchen mit Bindemitteln versehen sein können, die mit bestimmten Strukturen eine chemische Bindung oder eine Bindung aufgrund von Adhäsion eingehen können. Eine rein mechanische Bindung ist ebenfalls denkbar. Nachdem die Teilchen der interessierenden Struktur oder den interessierenden Strukturen zugeordnet sind, erfolgt der Nachweis der Struktur bzw. der Strukturen durch
- 10 Nachweis der in bzw. an den Präparaten und somit an den jeweiligen Strukturen gebundenen Teilchen. Im Konkreten lassen sich die Strukturen bzw. unterschiedlichen Bereiche in den Präparaten dadurch differenzieren, dass die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, dass sich die
- 15 Teilchen aufgrund der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung nachweisen lassen.

In erfindungsgemäßer Weise wird demnach ein physikalisches Phänomen genutzt, welches in der Fachliteratur als „Mie-Streuung“ bezeichnet wird. Hierzu wird lediglich beispielhaft auf G. Mie, Ann. Physik 3, 377 (1908) verwiesen.

- 20 Hinsichtlich theoretischer Grundlagen betreffend die Mie-Streuung wird des weiteren verwiesen auf P. Török et al. „Polarised Light Microscopy“ SPIE Vol. 3261, 22 ff. (1998). Unter der nach dem Physiker G. Mie bezeichneten Erscheinung – Mie-Streuung oder Mie-Reflex – versteht man eine Streuung von Licht an Teilchen, wobei mit wachsendem Durchmesser der Teilchen die
- 25 Streuintensität in Vorwärtsrichtung stärker zunimmt als in Rückwärtsrichtung. Im Gegensatz zur Rayleigh-Streuung hängt die Mie-Streuung sowohl von den Materialeigenschaften (Elektrizitätskonstante, elektrische Leitfähigkeit) als auch von dem Durchmesser der streuenden Teilchen ab.

An dieser Stelle sei noch einmal ganz besonders hervorgehoben, dass in erfindungsgemäßer Weise die Markierung von Bereichen oder Strukturen zu deren differenzierter Untersuchung durch Zuordnung von Teilchen zu diesen Strukturen und durch anschließende Detektion der Teilchen erfolgt, wobei die

5 Detektion der Teilchen durch Ausnutzung der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung erfolgt. Das Phänomen der Mie-Streuung wird somit in erfindungsgemäßer Weise zum Nachweis der den Strukturen zugeordneten Teilchen und somit zum Nachweis der Strukturen selbst genutzt.

Statt des Nachweises über an den Teilchen auftretende Mie-Streuung kann der

10 Nachweis der Teilchen auch durch Detektion des Plasmonen-Signals erfolgen. Plasmonen sind aus der Literatur schon seit geraumer Zeit bekannt. Es handelt sich hierbei um ein Phänomen aus dem Bereich der Festkörperphysik, bei dem die Elektronen im Leitungsband eines Festkörpers Schwingungen ausführen, die durch beispielsweise Licht geeigneter Wellenlänge induzierbar sind. Dies wird  
15 bislang vor allem im Zusammenhang mit Messgeräten genutzt, die auf dem Oberflächen-Plasmonen-Resonanzeffekt beruhen. Lediglich beispielhaft wird dazu auf die US-PS 5,351,127 verwiesen, in der eine entsprechende Anordnung beschrieben ist. Für die Lichtmikroskopie im klassischen Sinne ist jedoch die Erzeugung und der Nachweis von Oberflächen-Plasmonen gemäß der zuvor  
20 vorgenannten Druckschrift nicht brauchbar.

Im Rahmen des zuvor genannten alternativen Nachweises der Teilchen durch Detektion des Plasmonen-Signals werden mit geeignetem Licht im konventionellen oder konfokalen Laserscanmikroskop Oberflächen- oder Volumen-Plasmonen-Resonanzen der Teilchen angeregt, die an der

25 nachzuweisenden Struktur spezifisch angebunden sind. Die so angeregten Oberflächen- oder Volumen-Plasmonen-Resonanzen werden dann mit geeigneten Mitteln nachgewiesen. In Abhängigkeit von der Eigenschaft des verwendeten Lichts und der Eigenschaft der verwendeten Teilchen ist ein

spezifischer Nachweis unterschiedlicher Teilchen möglich. Beispielsweise ist in sphärischen Teilchen nur eine begrenzte Anzahl von Oberflächen-Plasmonen verfügbar, die vom Durchmesser, der Elektronendichte und der Dielektrizitätseigenschaft der Teilchen abhängen.

- 5 In vorteilhafter Weise wird zur Beleuchtung der Teilchen linear polarisiertes Licht vorgebbarer Wellenlänge verwendet, um nämlich den Mie-Effekt bzw. die an den Teilchen auftretende Mie-Streuung besonders gut nutzen bzw. detektieren zu können. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Wellenlänge des Lichts größer oder in etwa gleich dem Durchmesser der Teilchen ist.
- 10 In besonderes vorteilhafter Weise könnte die Wellenlänge des Lichts im Bereich zwischen 300 nm und 1.500 nm liegen. Die Größe der Teilchen könnte unterhalb des optischen Auflösungsvermögens liegen. Im Konkreten kommt hier ein Teilchendurchmesser im Bereich zwischen 10 nm und 1.000 nm in Frage, um nämlich die Mie-Streuung zur Detektion der Teilchen optimal nutzen zu können.
- 15 In weiter vorteilhafter Weise wird die Wellenlänge des Lichts – bei gegebener Teilchengröße und gegebenen spezifischen Eigenschaften der Teilchen – derart gewählt, dass ein maximaler Mie-Reflex nachweisbar ist. Ausgehend von den hier zugrundeliegenden theoretischen Grundlagen gemäß den eingangs zitierten Literaturstellen wird hierzu auf Figur 1 bzw. auf die dortige Grafik verwiesen, die 20 für bestimmte Teilchendurchmesser, nämlich für Durchmesser von 20 nm, 40 nm, 60 nm, 80 nm und 100 nm, die aufgrund der Mie-Streuung detektierbaren Reflexe in Abhängigkeit von der Wellenlänge des Beleuchtungslichts zeigt. Gemäß dieser Darstellung lässt sich bei gegebener Teilchengröße diejenige Wellenlänge des Lichts auswählen, bei der – bei einem bestimmten Teilchen vorgegebenen 25 Durchmessers – ein maximaler Mie-Reflex bzw. eine maximale Mie-Streuung nachweisbar und somit detektierbar ist.

Grundsätzlich ist es möglich, dass nicht nur ein Bereich des Präparats mit einem Typ von Teilchen – gleichen Durchmessers und gleicher Eigenschaften – versehen wird, sondern dass vielmehr voneinander zu differenzierende Bereiche des Präparates mit Teilchen unterschiedlicher Durchmesser versehen werden, so

5 dass mittels geeignetem Licht unterschiedlicher Wellenlängen die Bereich simultan detektierbar sind. Ebenso ist es möglich, die zu differenzierenden Bereiche des Präparats mit Teilchen unterschiedlicher spezifischer Eigenschaften – bei unterschiedlichen oder gleichen Durchmessern – zu versehen, so dass mittels geeignetem Licht unterschiedlicher oder gleicher Wellenlängen die

10 Bereiche simultan detektierbar sind. Beide Varianten zur Differenzierung zwischen unterschiedlichen Bereichen des Präparats sind realisierbar.

Bei den zur Markierung dienenden Teilchen handelt es sich bevorzugt um Metallteilchen, und zwar aufgrund deren Elektrizitätskonstante und elektrischer Leitfähigkeit. Ebenso kann es sich bei den Teilchen um an der Oberfläche

15 metallisierte Teilchen handeln. Die Teilchen sind weiter vorzugsweise ellipsoid oder als Kugeln ausgeführt, um nämlich eine homogene Mie-Streuung an den Teilchen zu erhalten.

Der Nachweis der Teilchen über die dort auftretende Mie-Streuung bzw. über die dort auftretenden Mie-Reflexe kann über ein Mikroskop erfolgen, und zwar

20 sowohl im Transmissionsmikroskop-Modus als auch im Reflexionsmikroskop-Modus. Erfolgt der Nachweis im Transmissionsmikroskop-Modus, so könnte ein konventionelles Polarisations-Transmissionsmikroskop oder ein konfokales Polarisations-Transmissionsmikroskop verwendet werden. Erfolgt der Nachweis im Reflexionsmikroskop-Modus, könnte ein konventionelles Polarisations-Reflexionsmikroskop oder ein konfokales Polarisations- Reflexionsmikroskop zur Realisierung der Nachweismethode verwendet werden.

Als Lichtquelle kommt beispielsweise eine Hochdruckdampflampe in Frage, wobei diese vorzugsweise wellenlängenselektierende und polarisierende Mittel aufweisen sollte. Diese wellenlängenselektierenden und polarisierenden Mittel können einer herkömmlichen Hochdruckdampflampe auch – separat –

5 nachgeschaltet sein.

In besonders vorteilhafter Weise lässt sich als Lichtquelle ein Laser verwenden, insbesondere dann, wenn die konfokale Laserscanmikroskopie angewandt werden soll. In vorteilhafter Weise handelt es sich hier um einen Laser, der polarisiertes Licht einer Wellenlänge emittiert. Ebenso ist der Einsatz eines

10 Lasers denkbar, der polarisiertes Licht mehrerer unterschiedlicher Wellenlängen emittiert, wobei dem Laser wellenlängenselektierende Mittel – integral oder separat – nachgeordnet sind. Auf konventionelle Laser und konventionelle wellenlängenselektierende Mittel kann hier zurückgegriffen werden.

Zum optimalen Nachweis der Mie-Signale ist es von weiterem Vorteil, wenn man 15 einen dem Laser nachgeordneten OPO (optisch parametrischen Oszillator) als Lichtquelle verwendet. Dadurch ist es nämlich möglich, die Beleuchtungswellenlänge quasi kontinuierlich einzustellen, wodurch für eine bestimmte Teilchenart maximale Nachweissignale detektierbar sind.

Im Hinblick auf die Analyse des Präparats ist es von Vorteil, wenn zur 20 Auswertung mehrere Bildaufnahmen hinzugezogen werden, um nämlich Fehler bei der Bildaufnahme eliminieren bzw. kompensieren zu können. Insoweit könnte zu einer Bildaufnahme zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles durchlichtmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bilddatenwertung berücksichtigt werden. Digitale Bildverarbeitungsmethoden können Anwendung 25 finden. Jedenfalls lassen sich mit dem Vergleich eines konventionellen Durchsichtmikroskopbildes systematische Fehler des jeweiligen Mikroskops eliminieren bzw. kompensieren.

Ebenso ist es denkbar, daß zur Analyse des Präparats zu einer Bildaufnahme zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles reflexionsmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bildaufnahme berücksichtigt wird. Auch hier lassen sich digitale Bildverarbeitungsmethoden

5 anwenden. Die Verarbeitung eines reflexionsmikroskopischen Bildes mit einem durchlichtmikroskopischen Bild des Präparats ist ebenso denkbar, sofern beide Aufnahmen über das gleiche Mikroskop aufgenommen sind. Diese Aufnahmen werden zur Analyse des Präparats herangezogen und bei der Bildauswertung nach Anwendung digitaler Bildverarbeitungsmethoden berücksichtigt.

10 Im Hinblick auf die Bildaufnahme und anschließende Bildverarbeitung ist es von weiterem Vorteil, wenn mehrere Bildaufnahmen unter verschiedenen Beleuchtungs-/Detektionswinkeln durchgeführt werden. Auch diese Bildaufnahmen können bei der Bildauswertung berücksichtigt werden, um beispielsweise die Analyse bzw. das Ergebnis verfälschende Schatteneffekte 15 oder dergleichen eliminieren zu können. Auch hier lassen sich digitale Bildverarbeitungsmethoden anwenden.

Das zum Nachweis der Teilchen und somit zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen dienenden Licht kann über eine einzige Lichtquelle bereitgestellt werden, so beispielsweise über eine Laserlichtquelle gemäß der 20 voranstehenden Beschreibung. Ist es jedoch erforderlich, zum Nachweis von Teilchen mit unterschiedlichen Durchmessern und/oder mit unterschiedlichen Eigenschaften Licht mit mehreren Wellenlängen bereitzustellen, so können dazu mehrere Lichtquellen verwendet werden, die Licht mit geeigneten Wellenlängen simultan oder zeitlich versetzt emittieren. Insoweit ist eine simultane oder zeitlich 25 versetzte Detektion der den unterschiedlichen Strukturen zugeordneten Teilchen möglich.

Bereits zuvor ist erwähnt worden, dass es sich bei den Teilchen einerseits um metallische Teilchen und andererseits um Teilchen mit metallischer Oberfläche handeln kann. Zur Bindung der Teilchen an das Präparat bzw. an die jeweiligen Strukturen ist es von ganz besonderem Vorteil, wenn die Teilchen des weiteren 5 oberflächenbeschichtet sind und wenn die Beschichtung eine spezifische Bindung an entsprechend komplementäre Strukturen des Präparats ermöglicht. Die Bindung kann mechanisch, adhäsiv oder gar chemisch erfolgen.

Abschließend sei ganz besonders hervorgehoben, dass das erfindungsgemäße Verfahren gegenüber der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie den enormen 10 Vorteil hat, dass die zur Markierung dienenden Teilchen – im Gegensatz zu den Fluoreszenzfarbstoffen – sich im Zeitverlauf und während der Bestrahlung nicht verändern. Des weiteren müssen die zur Ermittlung der Mie-Streuung bzw. der Mie-Reflexion dienenden Sensoren nicht so sensitiv ausgelegt sein, wie dies bei 15 der Fluoreszenzmikroskopie – zur Detektion der Fluoreszenzerscheinungen – der Fall ist. Sind die Präparate bzw. deren Strukturen einmal mit den hier verwendeten Teilchen präpariert, lassen sich weitere Untersuchungen an den Präparaten auch nach erheblicher Bestrahlung reproduzierbar durchführen. Jedenfalls sind dabei nicht die zur Markierung dienenden Teilchen problematisch, sondern lediglich die Haltbarkeit des Präparats selbst. Auf sich zeitlich 20 verändernde Markierungen ist in erfindungsgemäßer Weise jedenfalls nicht mehr zu achten.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in vorzugsweise biologischen Präparaten, insbesondere mittels konfokaler Laserscanmikroskopie, **dadurch gekennzeichnet**, dass den Strukturen Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Eigenschaften zugeordnet werden und dass der Nachweis der Strukturen durch Nachweis der in bzw. an den Präparaten spezifisch gebundenen Teilchen erfolgt.
- 10 2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Nachweis der Teilchen dadurch erfolgt, daß die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, daß sich die Teilchen aufgrund der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung nachweisen lassen.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Nachweis der Teilchen dadurch erfolgt, daß die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, daß sich die Teilchen aufgrund des an den Teilchen auftretenden Plasmonen-Signals nachweisen lassen
- 20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass linear polarisiertes Licht vorgebbarer Wellenlänge verwendet wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass die Wellenlänge des Lichts größer oder in etwa gleich dem Durchmesser der Teilchen ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass die Wellenlänge des Lichts in einem Bereich zwischen 300 nm und 1.500 nm liegt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass die Größe der Teilchen unterhalb des optischen Auflösungsvermögens liegt.
- 10 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass die Teilchen einen Durchmesser im Bereich zwischen 10 nm und 1.500 nm haben.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass die Wellenlänge des Lichts derart gewählt wird, dass bei gegebener Teilchengröße und spezifischer Eigenschaft der Teilchen ein maximaler Mie-Reflex nachweisbar ist.
- 15 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass zu differenzierende Bereiche des Präparats mit Teilchen unterschiedlicher Durchmesser versehen werden, so dass mittels geeignetem Licht unterschiedlicher Wellenlängen die Bereiche simultan oder nacheinander detektierbar sind.
- 20 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass zu differenzierende Bereiche des

Präparats mit Teilchen unterschiedlicher spezifischer Eigenschaften versehen werden, so dass mittels geeignetem Licht unterschiedlicher oder gleicher Wellenlängen die Bereiche simultan oder nacheinander detektierbar sind.

- 5 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass es sich bei den Teilchen um Metallteilchen handelt.
- 10 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass es sich bei den Teilchen um an der Oberfläche metallisierte Teilchen handelt.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass die Teilchen als Ellipsoide oder Kugeln ausgeführt sind.
- 15 15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass der Nachweis der Teilchen über die dort auftretenden Mie-Reflexe im Transmissionsmikroskop-Modus erfolgt.
16. Verfahren nach Anspruch 15, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass als Mikroskop ein konventionelles Polarisations-Transmissionsmikroskop verwendet wird.
- 20 17. Verfahren nach Anspruch 16, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass als Mikroskop ein konfokales Polarisations-Transmissionsmikroskop verwendet wird.

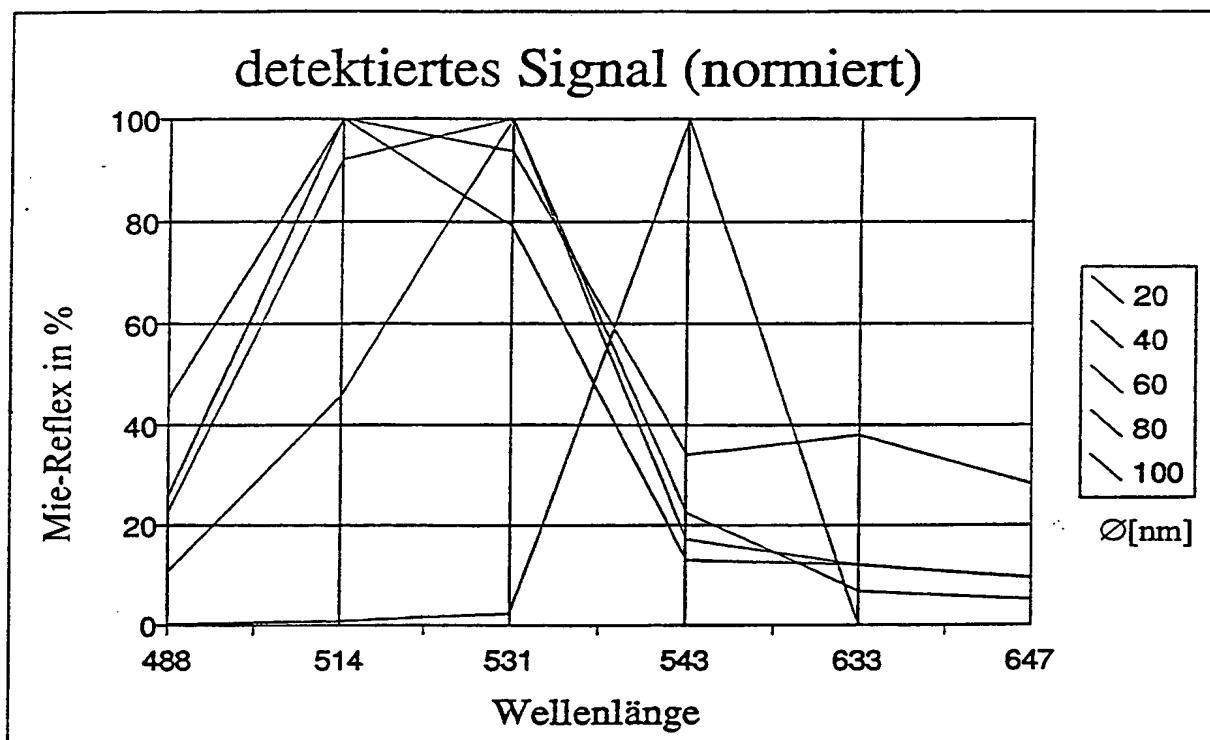
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass der spezifische Nachweis der Teilchen über die dort auftretenden Mie-Reflexe im Reflexionsmikroskop-Modus erfolgt.
- 5 19. Verfahren nach Anspruch 18, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass als Mikroskop ein konventionelles Polarisations-Reflexionsmikroskop verwendet wird.
- 10 20. Verfahren nach Anspruch 19, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass als Mikroskop ein konfokales Polarisations-Reflexionsmikroskop verwendet wird.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass als Lichtquelle eine Hochdruckdampflampe, vorzugsweise mit wellenlängenselektierenden und polarisierenden Mitteln, verwendet wird.
- 15 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass als Lichtquelle ein Laser verwendet wird, der polarisiertes Licht einer Wellenlänge emittiert.
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass als Lichtquelle ein OPO (optisch parametrischer Oszillator) verwendet wird, mit dem die Wellenlänge des Beleuchtungslichts variiert werden kann, mit dem Ziel, ein für eine bestimmte Teilchenart maximales Mie-Signal messen zu können.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass als Lichtquelle ein Laser verwendet wird, der polarisiertes Licht mehrerer unterschiedlicher Wellenlängen emittiert, wobei dem Laser wellenlängenselektierende Mittel – integral oder separat – nachgeordnet sind.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass zur Analyse des Präparats zu einer Bildaufnahme zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles durchlichtmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bildauswertung, beispielsweise mit digitalen Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt wird.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 24, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass zur Analyse des Präparats zu einer Bildaufnahme zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles reflexionsmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bildauswertung, beispielsweise mit digitalen Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt wird.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 26, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass sowohl ein reflexionsmikroskopisches Bild als auch ein durchlichtmikroskopisches Bild des Präparats über das gleiche Mikroskop aufgenommen, zur Analyse des Präparats herangezogen und bei der Bildauswertung, beispielsweise mittels digitaler Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt wird.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 27, **d a d u r c h**  
**g e k e n n z e i c h n e t**, dass Bildaufnahmen unter verschiedenen Beleuchtungs-/Detektionswinkeln durchgeführt werden und dass diese

Bildaufnahmen bei der Bildauswertung, beispielsweise mittels digitaler Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt werden.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 28, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass das zum Nachweis der Teilchen dienende Licht über eine einzige Lichtquelle bereitgestellt wird.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 29, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass das zum Nachweis der Teilchen mit unterschiedlichen Durchmessern und/ unterschiedlichen Eigenschaften dienende Licht über mehreren Lichtquellen geeigneter Wellenlänge **10** simultan oder zeitlich versetzt bereitgestellt wird.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 30, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass die Teilchen oberflächenbeschichtet sind und daß die Beschichtung eine spezifische Bindung an entsprechend komplementäre Strukturen des Präparats ermöglicht.

THIS PAGE BLANK (reverse)



**Figur**

THIS PAGE BLANK (UPSTO)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/03946

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 G02B21/00 G01N21/55

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 7 G02B G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 843 651 A (D.I. STIMPSON ET AL.) 1 December 1998 (1998-12-01)	1, 2, 4-8, 12-14, 21, 22, 29, 31 28
A	column 2, line 10 - line 27 column 7, line 31 - line 35 column 8, line 57 -column 9, line 9 column 14, line 15 - line 27 column 19, line 35 -column 20, line 51	
X	EP 0 254 430 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC) 27 January 1988 (1988-01-27)  page 3, line 48 -page 4, line 9 page 3, line 37 - line 40	1, 2, 4-8, 12-14, 21-23, 29
		-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

13 March 2000

21/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl.  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Scheu, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 99/03946

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>EP 0 326 375 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC.) 2 August 1989 (1989-08-02)</p> <p>column 7, line 33 -column 8, line 60 column 15, line 48 - line 52</p>	1,2,4-8, 12-14, 21,22, 24,29-31
P,X	<p>WO 99 13319 A (AFFYMETRIX INC ;RAVA RICHARD P (US); TRULSON MARK O (US); WALTON I) 18 March 1999 (1999-03-18)</p> <p>page 1 -page 2, paragraph 1 page 7, paragraph 4 -page 8, paragraph 2 page 10, paragraph 1 page 11, paragraph 4</p>	1,4-8, 12,14, 21,22, 28-30

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/03946

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 5843651	A	01-12-1998		US 5599668 A AU 3636295 A CA 2197321 A EP 0783683 A JP 10506190 T WO 9609532 A	04-02-1997 09-04-1996 28-03-1996 16-07-1997 16-06-1998 28-03-1996
EP 0254430	A	27-01-1988		AT 94285 T AU 597077 B AU 7478387 A CA 1288689 A DE 3787332 D DE 3787332 T JP 2591750 B JP 63008560 A MX 169795 B US 5017009 A	15-09-1993 24-05-1990 07-01-1988 10-09-1991 14-10-1993 07-04-1994 19-03-1997 14-01-1988 27-07-1993 21-05-1991
EP 326375	A	02-08-1989		US 5017009 A AU 2833389 A CA 1317006 A DK 33589 A GR 1000729 B JP 1282447 A PT 89541 A,B US 4979821 A	21-05-1991 27-07-1989 27-04-1993 28-07-1989 23-11-1992 14-11-1989 04-10-1989 25-12-1990
WO 9913319	A	18-03-1999		AU 9378898 A	29-03-1999

THIS PAGE BLANK (use for)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/DE 99/03946

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 G02B21/00 G01N21/55

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G02B G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGEBEHNE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 843 651 A (D.I. STIMPSON ET AL.) 1. Dezember 1998 (1998-12-01)	1, 2, 4-8, 12-14, 21, 22, 29, 31 28
A	Spalte 2, Zeile 10 - Zeile 27 Spalte 7, Zeile 31 - Zeile 35 Spalte 8, Zeile 57 - Spalte 9, Zeile 9 Spalte 14, Zeile 15 - Zeile 27 Spalte 19, Zeile 35 - Spalte 20, Zeile 51	
X	EP 0 254 430 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC) 27. Januar 1988 (1988-01-27)  Seite 3, Zeile 48 - Seite 4, Zeile 9 Seite 3, Zeile 37 - Zeile 40	1, 2, 4-8, 12-14, 21-23, 29
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:  
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  
"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist  
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden  
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist  
"%" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Anmeldedatum des Internationalen Recherchenberichts

13. März 2000

21/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl  
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Scheu, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Formular Nr. 1000 Altenzeichen

PCT/DE 99/03946

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>EP 0 326 375 A (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC.) 2. August 1989 (1989-08-02)</p> <p>Spalte 7, Zeile 33 -Spalte 8, Zeile 60 Spalte 15, Zeile 48 - Zeile 52</p>	<p>1,2,4-8, 12-14, 21,22, 24,29-31</p>
P,X	<p>WO 99 13319 A (AFFYMETRIX INC ;RAVA RICHARD P (US); TRULSON MARK O (US); WALTON I) 18. März 1999 (1999-03-18)</p> <p>Seite 1 -Seite 2, Absatz 1 Seite 7, Absatz 4 -Seite 8, Absatz 2 Seite 10, Absatz 1 Seite 11, Absatz 4</p>	<p>1,4-8, 12,14, 21,22, 28-30</p>

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Reg. des Aktenzeichen

PCT/DE 99/03946

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5843651	A	01-12-1998		US 5599668 A		04-02-1997
				AU 3636295 A		09-04-1996
				CA 2197321 A		28-03-1996
				EP 0783683 A		16-07-1997
				JP 10506190 T		16-06-1998
				WO 9609532 A		28-03-1996
EP 0254430	A	27-01-1988		AT 94285 T		15-09-1993
				AU 597077 B		24-05-1990
				AU 7478387 A		07-01-1988
				CA 1288689 A		10-09-1991
				DE 3787332 D		14-10-1993
				DE 3787332 T		07-04-1994
				JP 2591750 B		19-03-1997
				JP 63008560 A		14-01-1988
				MX 169795 B		27-07-1993
				US 5017009 A		21-05-1991
EP 326375	A	02-08-1989		US 5017009 A		21-05-1991
				AU 2833389 A		27-07-1989
				CA 1317006 A		27-04-1993
				DK 33589 A		28-07-1989
				GR 1000729 B		23-11-1992
				JP 1282447 A		14-11-1989
				PT 89541 A, B		04-10-1989
				US 4979821 A		25-12-1990
WO 9913319	A	18-03-1999		AU 9378898 A		29-03-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

47  
**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
 GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

**(Artikel 36 und Regel 70 PCT)**

REC'D 22 FEB 2001

WIPO

PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts  E 0397 WO	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen  PCT/DE99/03946	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)  10/12/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag)  17/12/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK G02B21/00		
Anmelder  LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH et al.		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.</p>		
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorität</li> <li>III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li> <li>VI <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li> <li>VII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li> <li>VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li> </ul>		

Datum der Einreichung des Antrags  17/05/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  20.02.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Schmidt, C.  Tel. Nr. +49 89 2399 2254



THIS PAGE BLANK (use to)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03946

**I. Grundlag d s B richts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*);  
**Beschreibung, Seiten:**

1-3,5-9 ursprüngliche Fassung

4,4a eingegangen am 29/11/2000 mit Schreiben vom 29/11/2000

**Patentansprüche, Nr.:**

21-31 ursprüngliche Fassung

1-20 eingegangen am 29/11/2000 mit Schreiben vom 29/11/2000

**Zeichnungen, Blätter:**

1/1 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

THIS PAGE BLANK (reverse)

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03946

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

**4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:**

Beschreibung, Seiten:  
 Ansprüche, Nr.:  
 Zeichnungen, Blatt:

5.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

**6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:**

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1 - 20
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1 - 20
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1 - 20
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen**  
**siehe Beiblatt**

**VI. Bestimmte angeführte Unterlagen**

**1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)**

und / oder

**2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)**

**siehe Beiblatt**

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

THIS PAGE BLANK (USPS0)

**INTERNATIONALER VORLAUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE99/03946

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:  
siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (up to)

## **DOKUMENTE**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: US-A-5 843 651 (D.I. STIMPSON ET AL.) 1. Dezember 1998 (1998-12-01)
- D2: EP-A-0 254 430 (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC) 27. Januar 1988 (1988-01-27)
- D3: EP-A-0 326 375 (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC.) 2. August 1989 (1989-08-02)
- D4: WO 99 13319 A (AFFYMETRIX INC ; RAVA RICHARD P (US); TRULSON MARK O (US); WALTON I) 18. März 1999 (1999-03-18)
- D5: EP-A-0 469 377 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)
- D6: EP-A-0 822 407 (FORSCHUNGSZENTRUM ROSENDORF).

## **ZU PUNKT V**

1. Die vorliegende Erfindung erfüllt das in Artikel 33 (3) PCT genannte Kriterium nicht, weil der Gegenstand des Anspruchs 1 nicht auf einer erforderlichen Tätigkeit beruht.

Die Erfindung geht, nach der Beschreibung, von konventioneller Fluoreszenzmikroskopie, wie sie im biomedizinischen Bereich Anwendung findet, aus. Dabei werden zur differenzierten mikroskopischen Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in biologischen Präparaten den Strukturen Teilchen mit Fluoreszenzfarbstoffen zugeordnet. Das Problem bei diesen Teilchen ist, dass aufgrund der Ausbleichscharakteristik die Fluoreszenzintensitäten sich im Verlauf des Mikroskopierens verändern.

Die Lösung nach Anspruch 1 besteht darin, Teilchen zu verwenden, die unabhängig von der Zeit der Bestrahlung konstante Eigenschaften besitzen.

Derartige Markierungsverfahren bzw. Teilchen sind jedoch im Stand der Technik schon bekannt, wie aus den zitierten Dokumenten ersichtlich:

THIS PAGE BLANK (up to)

Dokument D1 offenbart ein Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in Präparaten, wobei den Strukturen Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Eigenschaften zugeordnet werden, und wobei der Nachweis der Strukturen durch Nachweis der an den Präparaten gebundenen Teilchen erfolgt (siehe insbesondere: Abstract: "scattering labels specifically bound to the waveguide" sowie Spalte 1, Zeile 9 - 17, Spalte 2, Z. 10 - 27 und Anspruch 1).

Die Dokumente D2 und D3 offenbaren Verfahren zur Untersuchung von Präparaten (Immunoassay), bei denen Teilchen (colloidal gold label) den Strukturen zugeordnet werden.

Dokument D4 beschreibt auf S. 1, letzten 2 Zeilen, dass es im Stand der Technik schon bekannt ist, statt fluoreszierende Teilchen streuende Teilchen zu benutzen.

Auch wenn diese Dokumente sich nicht explizit auf Mikroskopie beziehen, zeigen sie doch, dass auf dem Gebiet der chemischen Analyse, u.a. von biologischen Materialien, die Verwendung von streuenden Teilchen durchaus allgemein bekannt ist. Hieraus folgt, dass der Fachmann, der das Problem der Veränderung der Intensität bei fluoreszierenden Teilchen lösen will, eine klare Anregung zur Benutzung von streuenden Teilchen bekommt. Somit kann der Anspruch 1 nicht als erfinderisch betrachtet werden.

2. Die abhängigen Ansprüche enthalten keine Merkmale, die in Kombination mit den Merkmalen irgendeines Anspruchs, auf den sie sich beziehen, die Erfordernisse des PCT in bezug auf erfinderische Tätigkeit erfüllen. Die Gründe dafür sind die folgenden:
  - Die Verwendung von Mie-Streuung ist auf dem Gebiet üblich und z.B. schon aus D1 bis D3 bekannt; die Verwendung von Plasmonen ist aus D5 und D6 auf dem Gebiet der chemischen Analyse bekannt.  
Die Benutzung von polarisiertem Licht in dem angegebenen Bereich ist üblich, wie aus den zitierten Dokumenten ersichtlich.
  - In D3 wird eine Partikelgrösse von 40nm vorgeschlagen (Sp. 15, Z. 49).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- Die Wellenlänge zu optimieren ist für den Fachmann selbstverständlich und auch in D3 (Sp. 18, Z. 40-58) vorgeschlagen.
- Auch in D1 bis D3 werden metallische Partikel, z.B. Ellipsoide oder Kugeln, verwendet.
- Die Verwendung von Transmissions- bzw. Reflexions-Mikroskopie ist allgemein bekannt auf dem Gebiet der Analytik.
- Auch in D1 bis D3 werden herkömmliche Lichtquellen wie Laser oder Hochdrucklampen verwendet (D3. Sp. 7, Z. 32-39).
- Die Verwendung elektronischer Bildanalyse ist z.B. in D1, Sp. 19, Z. 55, erwähnt.
- Eine Oberflächenbeschichtung ist auf dem Gebiet üblich.

## **ZU PUNKT VI**

Das Dokument D4 wurde zwar nach dem Prioritätstag der Anmeldung veröffentlicht, könnte jedoch in der regionalen Phase wichtig sein (z.B. unter A. 54 (3) EPÜ). Dieses Dokument offenbart ein Verfahren zur Untersuchung von Präparaten, wobei streuende und reflektierende Metallteilchen für die Markierung von Bereichen benutzt werden.

## **ZU PUNKT VII**

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den oben zitierten Dokumenten D2 bis D6 offenbare einschlägigen Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

Auf S. 2, nach Angabe der Erfindung, fehlt eine Zusammenfassung der Figuren (in diesem Fall nur eine Figur); siehe Regel 5.1 a) iv) und b) PCT.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

An dieser Stelle sei noch einmal ganz besonders hervorgehoben, dass in erfindungsgemäßer Weise die Markierung von Bereichen oder Strukturen zu deren differenzierter Untersuchung durch Zuordnung von Teilchen zu diesen Strukturen und durch anschließende Detektion der Teilchen erfolgt, wobei die Detektion der Teilchen durch Ausnutzung der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung erfolgt. Das Phänomen der Mie-Streuung wird somit in erfindungsgemäßer Weise zum Nachweis der den Strukturen zugeordneten Teilchen und somit zum Nachweis der Strukturen selbst genutzt.

Statt des Nachweises über an den Teilchen auftretende Mie-Streuung kann der Nachweis der Teilchen auch durch Detektion des Plasmonen-Signals erfolgen. Plasmonen sind aus der Literatur schon seit geraumer Zeit bekannt. Es handelt sich hierbei um ein Phänomen aus dem Bereich der Festkörperphysik, bei dem die Elektronen im Leitungsband eines Festkörpers Schwingungen ausführen, die durch beispielsweise Licht geeigneter Wellenlänge induzierbar sind. Dies wird bislang vor allem im Zusammenhang mit Messgeräten genutzt, die auf dem Oberflächen-Plasmonen-Resonanzeffekt beruhen. Lediglich beispielhaft wird dazu auf die US-PS 5,351,127 verwiesen, in der eine entsprechende Anordnung beschrieben ist. Für die Lichtmikroskopie im klassischen Sinne ist jedoch die Erzeugung und der Nachweis von Oberflächen-Plasmonen gemäß der zuvor vorgenannten Druckschrift nicht brauchbar.

Als weiteren Stand der Technik ist das U.S. Patent 5,843,651 zu nennen, das die Detektierbarkeit verschiedener spezifischer Bindungspartner ermöglicht. Die Bindungspartner sind dabei DNA-Moleküle, die sich auf bestimmten Rezeptoren in einem Wellenleiter anlagern. Die Anlagerung erfolgt in einer flüssigen Phase an einer Oberfläche des Wellenleiters, die bestimmte künstliche Rezeptorstellen besitzt. Das Vorhandensein einer Bindung, bzw. des zu suchenden Stoffes, wird mittels Lichtstreuung bestimmt. Mit dem Verfahren ist es nicht möglich biologische Strukturen in einem biologischen Präparat nachzuweisen.

THIS PAGE BLANK (up to)

Im Rahmen des zuvor genannten alternativen Nachweises der Teilchen durch Detektion des Plasmonen-Signals werden mit geeignetem Licht im

- 5 konventionellen oder konfokalen Laserscanmikroskop Oberflächen- oder Volumen-Plasmonen-Resonanzen der Teilchen angeregt, die an der nachzuweisenden Struktur spezifisch angebunden sind. Das verwendete Licht kann z.B. linear polarisiertes Licht mit vorgebbarer Wellenlänge sein. Die so angeregten Oberflächen- oder Volumen-Plasmonen-Resonanzen werden dann
- 10 mit geeigneten Mitteln nachgewiesen. In Abhängigkeit von der Eigenschaft des verwendeten Lichts und der Eigenschaft der verwendeten Teilchen ist ein

THIS PAGE BLANK (USPS10)

### Patentansprüche

1. Verfahren zur differenzierten Untersuchung unterschiedlicher Strukturen in biologischen Präparaten, mit einem Mikroskop, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass den Strukturen Teilchen mit spezifischem Durchmesser und spezifischen Eigenschaften zugeordnet werden, dass der Nachweis der Strukturen durch Nachweis der spezifisch in bzw. an den Strukturen des Präparats gebundenen Teilchen erfolgt, und dass Licht auf die Teilchen einwirkt, wobei die Teilchen unabhängig von der Zeit der Bestrahlung durch das Licht konstante Eigenschaften besitzen.  
10
2. Verfahren nach Anspruch 1, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass der Nachweis der Teilchen dadurch erfolgt, daß die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, daß sich die Teilchen aufgrund der an den Teilchen auftretenden Mie-Streuung nachweisen lassen.  
15
3. Verfahren nach Anspruch 1, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass der Nachweis der Teilchen dadurch erfolgt, daß die Wellenlänge geeigneten Lichts in Abhängigkeit des Durchmessers und der spezifischen Eigenschaften der Teilchen derart gewählt wird, daß sich die Teilchen aufgrund des an den Teilchen auftretenden Plasmonen-Signals nachweisen lassen  
20
4. Verfahren nach Anspruch 2, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass die Wellenlänge des Lichts größer oder in etwa gleich dem Durchmesser der Teilchen ist.  
25

THIS PAGE BLANK (useptd)

5. Verfahren nach Anspruch 1, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass zu differenzierende Bereiche des Präparats mit Teilchen unterschiedlicher Durchmesser versehen werden, so dass mittels geeignetem Licht unterschiedlicher Wellenlängen die differenzierenden Bereiche simultan oder nacheinander detektierbar sind.
6. Verfahren nach Anspruch 1, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass es sich bei den Teilchen um Metallteilchen oder um an der Oberfläche metallisierte Teilchen handelt.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass die Teilchen als Ellipsoide oder Kugeln ausgeführt sind.
8. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass der Nachweis der Teilchen über die dort auftretenden Mie-Reflexe im Transmissionsmikroskop-Modus erfolgt.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 8, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass als Mikroskop ein konventionelles Polarisations-Transmissionsmikroskop oder ein konfokales Polarisations-Transmissionsmikroskop verwendet wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t**, dass der spezifische Nachweis der Teilchen über die dort auftretenden Mie-Reflexe im Reflexionsmikroskop-Modus erfolgt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass als Mikroskop ein konventionelles Polarisations-Reflexionsmikroskop oder ein konfokales Polarisations-Reflexionsmikroskop verwendet wird.
  
- 5 12. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Licht mit einer Hochdruckdampflampe als Lichtquelle, vorzugsweise mit wellenlängenselektierenden und polarisierenden Mitteln, erzeugt wird.
  
- 10 13. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Licht mit einem Laser als Lichtquelle erzeugt wird, wobei der Laser polarisiertes Licht einer Wellenlänge emittiert.
  
14. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Licht mit einem OPO (optisch parametrischer Oszillator) als Lichtquelle erzeugt wird, wobei mit dem OPO die Wellenlänge des Beleuchtungslichts variiert werden kann, mit dem Ziel, ein für eine bestimmte Teilchenart maximales Mie-Signal messen zu können.
  
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Licht mit einem Laser als Lichtquelle erzeugt wird, wobei der Laser polarisiertes Licht mehrerer unterschiedlicher Wellenlängen emittiert, und dem Laser wellenlängenselektierende Mittel – integral oder separat – nachgeordnet sind.
  
- 20 16. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Analyse des biologischen Präparats zu einer Bildaufnahme zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles

THIS PAGE BLANK (up to 10)

durchlichtmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bildauswertung, beispielsweise mit digitalen Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Analyse des biologischen Präparats zu einer Bilddurchmikroskopie zusätzlich mit dem gleichen Mikroskop ein konventionelles reflexionsmikroskopisches Bild aufgenommen und bei der Bildauswertung, beispielsweise mit digitalen Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt wird.
- 10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, dass sowohl ein reflexionsmikroskopisches Bild als auch ein durchlichtmikroskopisches Bild des biologischen Präparats über das gleiche Mikroskop aufgenommen, zur Analyse des biologischen Präparats herangezogen und bei der Bildauswertung, beispielsweise mittels digitaler Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt wird.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass Bilddurchmikroskopie unter verschiedenen Beleuchtungs-/Detektionswinkeln durchgeführt werden und dass diese Bilddurchmikroskopie bei der Bildauswertung, beispielsweise mittels digitaler Bildverarbeitungsmethoden, berücksichtigt werden.
- 20 20. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Teilchen oberflächenbeschichtet sind und daß die Beschichtung eine spezifische Bindung an entsprechend komplementäre Strukturen des Präparats ermöglicht.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

DM  
09/957960  
Translation  
5630

PATENT COOPERATION TREATY

④ 6  
5.22.2

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

3

Applicant's or agent's file reference E 0397 WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE99/03946	International filing date (day/month/year) 10 December 1999 (10.12.99)	Priority date (day/month/year) 17 December 1998 (17.12.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G02B 21/00		
Applicant LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

I  Basis of the report

II  Priority

III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

IV  Lack of unity of invention

V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

VI  Certain documents cited

VII  Certain defects in the international application

VIII  Certain observations on the international application

TC 680 MAIL ROOM  
RECEIVED  
14 FEB 2002

Date of submission of the demand 17 May 2000 (17.05.00)	Date of completion of this report 20 February 2001 (20.02.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPS01)

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE99/03946

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-3,5-9, as originally filed,  
pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
pages 4,4a, filed with the letter of 29 November 2000 (29.11.2000),  
pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the claims, Nos. 21-31, as originally filed,  
Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
Nos. 1-20, filed with the letter of 29 November 2000 (29.11.2000),  
Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_

the claims, Nos. \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/DE 99/03946

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-20	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-20	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

D1: US-A-5 843 651 (D.I. STIMPSON ET AL.), 1 December 1998 (1998-12-01)

D2: EP-A-0 254 430 (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC.), 27 January 1988 (1988-01-27)

D3: EP-A-0 326 375 (ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS INC.), 2 August 1989 (1989-08-02)

D4: WO-A-99/13319 (AFFYMETRIX INC.; RAVA RICHARD P. (US); TRULSON MARK O. (US); WALTON I.), 18 March 1999 (1999-03-18)

D5: EP-A-0 469 377 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH)

D6: EP-A-0 822 407 (FORSCHUNGSZENTRUM ROSENDORF).

1. The present invention does not meet the requirement of PCT Article 33(3) because the subject matter of Claim 1 does not involve an inventive step.

According to the description, the invention proceeds from the conventional fluorescence microscopy used in the biomedical field. In order to perform a differentiated microscopic examination of various structures in biological preparations, particles with fluorescent dyes are associated with the

THIS PAGE BLANK (reverse)

structures. The problem of these particles is that discolouring causes fluorescence intensities to be altered during microscopic examination.

The solution as per Claim 1 consists in using particles which possess constant properties whatever the irradiation time.

However, such labelling methods and particles are already known from the prior art, as shown by the citations.

D1 discloses a method for the differentiated examination of various structures in preparations, particles with specific diameter and specific properties being associated with the structures and the structures being detected by detecting the particles bound to the preparations (see, in particular, the abstract: "scattering labels specifically bound to the waveguide"; column 1, lines 9-17; column 2, lines 10-27; and Claim 1).

D2 and D3 disclose methods for examining preparations (immunoassays) during which particles (colloidal gold label) are associated with the structures.

D4 states on page 1, last two lines, that the use of scattering instead of fluorescent particles is already known from the prior art.

Even if those documents do not refer explicitly to microscopy, they show that the use of scattering particles is well known in the field of chemical analysis, *inter alia* of biological materials. As a result, a person skilled in the art seeking to solve the problem of the intensity alteration of

THIS PAGE BLANK (usep10)

fluorescent particles is clearly prompted to use scattering particles. Claim 1 therefore cannot be considered inventive.

2. The dependent claims do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the PCT requirement for inventive step, for the following reasons:

- The use of Mie scattering is normal practice in the field and already known from D1-D3, for example; the use of plasmons is known from D5 and D6 in the field of chemical analysis.

The use of polarised light in the range indicated is normal practice, as shown by the citations.

- D3 proposes a particle size of 40 nm (column 15, line 49).
- Wavelength optimisation is obvious to a person skilled in the art and is also proposed in D3 (column 18, lines 40-58).
- D1-D3 also use metallic particles, such as ellipsoids or spheres.
- The use of transmission or reflection microscopy is generally known in the field of analysis.
- D1-D3 also use conventional light sources such as lasers or high-pressure lamps (D3, column 7, lines 32-39).
- The use of electronic image analysis is mentioned in D1, column 19, line 55, for example.
- Surface coating is normal practice in this field.

THIS PAGE BLANK (USPS01)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/DE 99/03946

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX VI

Although document D4 was published after the priority date of the application, it could be important in the regional phase (for example under EPC Article 54(3)). That document discloses a method for examining preparations using scattering and reflecting metal particles for the labelling of regions.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.  
PCT/DE 99/03946

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to PCT Rule 5.1(a)(ii), the description does not cite documents D2-D6 and does not indicate the relevant prior art disclosed therein.

On page 2, after the description of the invention, the application fails to briefly describe the figures (in this case only one figure); see PCT Rule 5.1(a)(iv) and (b).

THIS PAGE BLANK (ISPT01)